

Reference /

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 11262399 A
(43) Date of publication of application: 28.09.1999

(51) Int. Cl C12Q 1/68
C07K 14/02, C12Q 1/70
// C12N 15/09

(21) Application number: 10087977	(71) Applicant: SRL INC
(22) Date of filing: 17.03.1998	(72) Inventor: MUKAIDE MASAKAZU KANEKO SHUICHI HIKICHI KAZUMASA

(54) PRIMER FOR DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS AND DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS USING THE PRIMER

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the subject new primer composed of a specific region of X gene of hepatitis B virus(HBV) having a specific base sequence, capable of specifically amplifying X gene of HBV without amplifying human-derived DNA and useful e.g. for the detection of HBV in high sensitivity.

SOLUTION: This primer is composed of a nucleic acid containing a base sequence expressed by formula or a base sequence complementary to the above base sequence. The base sequence is composed of consecutive ≥ 15 bases (T may be U) or is a base sequence

wherein $\leq 10\%$ of the bases are substituted, depleted, inserted or added and capable of amplifying the region of X gene of HBV by nucleic acid amplification using the nucleic acid as a primer. Not less than 70% of the bases constituting said nucleic acid are a new HBV detection primer existing in the 1 nt to 173 nt or 199 nt to 256 nt of the base sequence of formula or in its complementary region. It can specifically detect HBV without causing the amplification of human-derived DNA and is usable as a cancer marker of the patient of hepatitis C, etc.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

ATTCAGCTT GGTGTTT TCGGGGG AGGGGTTT TTAACCCCTT 10
TTCAGGGG ATGGGGG AGGGGGG TGGGGGG TGGGGGG 120
TCTTCTTG GGTGGGGG GGGGGGGG GGGGGGGG TGGGGGGG 140
TGGGGGGG GATGGGGG GGGGGGGG GGGGGGGG TGGGGGGG 160
TGGGGGGG GATGGGGG GGGGGGGG GGGGGGGG TGGGGGGG 180
TGGGGGGG GATGGGGG GGGGGGGG GGGGGGGG TGGGGGGG 200
TGGGGGGG GATGGGGG GGGGGGGG GGGGGGGG TGGGGGGG 220

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-262399

(43)公開日 平成11年(1999)9月28日

(51)Int.Cl.*

識別記号

P I

C 12 Q 1/88
C 07 K 14/02
C 12 Q 1/70
// C 12 N 15/09

C 12 Q 1/88
C 07 K 14/02
C 12 Q 1/70
C 12 N 15/00

A

ZNA

ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数18 FD (全 8 頁)

(21)出願番号

特願平10-87977

(71)出願人

390037006
株式会社エスアールエル
東京都立川市曙町二丁目41番19号

(22)出願日

平成10年(1998)3月17日

(72)発明者

向出 一
東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア
ールエル八王子ラボラトリーエ

(72)発明者

金子 周一
石川県金沢市泉野町1-2-3

(72)発明者

引地 一昌
東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア
ールエル八王子ラボラトリーエ

(74)代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54)【発明の名称】 B型肝炎ウイルス検出用プライマー及びそれを用いたB型肝炎ウイルスの検出方法

(57)【要約】

【課題】 高感度に、かつヒト由来のDNAを増幅することなく特異的にHBVを検出することができる、HBVの検出方法及びそのためのプライマーを提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくは該塩基配列に相補的な塩基配列のうち、連続する15塩基以上から成る塩基配列(ただし、TはUであってもよい)又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、これをプライマーとして用いた核酸増幅法によりHBVのX遺伝子の領域を増幅できる核酸から成り、かつ、該核酸を構成する塩基のうち、70%以上が配列番号1に示される塩基配列の1nt~173nt又は199nt~256ntの領域又はその相補的領域内に存在する、B型肝炎ウイルス検出用プライマーを提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくは該塩基配列に相補的な塩基配列のうち、連続する15塩基以上から成る塩基配列（ただし、TはUであつてもよい）又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、これをプライマーとして用いた核酸増幅法によりHBVのX遺伝子の領域を增幅できる核酸から成り、かつ、該核酸を構成する塩基のうち、70%以上が配列番号1に示される塩基配列の1nt～173nt又は199nt～256ntの領域又はその相補的領域内に存在する、B型肝炎ウイルス検出用プライマー。

【請求項2】 前記核酸を構成する塩基の70%以上が配列表の配列番号1に示される塩基配列の42～173nt若しくは199nt～256ntの領域又はその相補的領域内に存在する、請求項1記載のプライマー。

【請求項3】 前記核酸を構成する塩基の70%以上が配列表の配列番号1に示される塩基配列の42～87nt、140～173nt若しくは199nt～256ntの領域又はその相補的領域内に存在する、請求項2記載のプライマー。

【請求項4】 配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくは該塩基配列に相補的な塩基配列のうち、連続する15塩基以上から成る塩基配列（ただし、TはUであつてもよい）を有する核酸から成る請求項1ないし3のいずれか1項に記載のプライマー。

【請求項5】 プライマーを構成する塩基数が15～50である請求項1ないし4のいずれか1項に記載のプライマー。

【請求項6】 配列表の配列番号1に記載された塩基配列の91nt～71ntの領域中の連続する15塩基以上から成る塩基配列を有する請求項3記載のプライマー。

【請求項7】 配列表の配列番号2に記載された塩基配列を有する請求項6記載のプライマー。

【請求項8】 配列表の配列番号1に記載された塩基配列の185nt～146ntの領域と相補的な配列中の連続する15塩基以上から成る塩基配列を有する請求項3記載のプライマー。

【請求項9】 配列表の配列番号3に記載された塩基配列を有する請求項8記載のプライマー。

【請求項10】 配列表の配列番号1に記載された塩基配列の48nt～85ntの領域中の連続する15塩基以上から成る塩基配列を有する請求項3記載のプライマー。

【請求項11】 配列表の配列番号4に記載された塩基配列を有する請求項10記載のプライマー。

【請求項12】 配列表の配列番号1に記載された塩基配列の182nt～142ntの領域と相補的な配列中の連続する15塩基以上から成る塩基配列を有する請求項3記載のプライマー。

項3記載のプライマー。

【請求項13】 配列表の配列番号5に記載された塩基配列を有する請求項12記載のプライマー。

【請求項14】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載のプライマーであつて、配列表の配列番号1に示される塩基配列又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものをフォワード側プライマーとして用い、請求項1ないし5のいずれか1項に記載のプライマーであつて、配列表の配列番号1に示される塩基配列と相補的な配列又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものをリバース側プライマーとして用い、試料DNAを鉢型として用いた核酸増幅法により試料DNAを増幅し、増幅されたDNAを検出することを含む、B型肝炎ウイルスの検出方法。

【請求項15】 請求項6又は7に記載のプライマーをフォワード側プライマーとして用い、請求項8又は9に記載のプライマーをリバース側プライマーとして用いて行う請求項14記載の方法。

【請求項16】 請求項10又は11に記載のプライマーをフォワード側プライマーとして用い、請求項12又は13に記載のプライマーをリバース側プライマーとして用いて行う請求項14記載の方法。

【請求項17】 請求項14記載の方法により増幅された核酸を鉢型とし、請求項1ないし5のいずれか1項に記載のプライマーであつて、配列表の配列番号1に示される塩基配列又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものをフォワード側プライマーとして用い、請求項1ないし5のいずれか1項に記載のプライマーであつて、配列表の配列番号1に示される塩基配列と相補的な配列又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものをリバース側プライマーとして用いて鉢型DNAを増幅し、増幅された核酸を検出するB型肝炎ウイルスの検出方法。

【請求項18】 請求項6又は7に記載のプライマーをフォワード側プライマーとして用い、請求項8又は9に記載のプライマーをリバース側プライマーとして用いて第1回目の核酸増幅を行い、請求項10又は11に記載のプライマーをフォワード側プライマーとして用い、請求項12又は13に記載のプライマーをリバース側プライマーとして用いて第2回目の核酸増幅を行う請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、B型肝炎ウイルス（以下、「HBV」ということがある）検出用プライマー及びそれを用いたHBV検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、血清等の試料中のHBVの検出は主として分岐DNAプローブ法により行われている。この方法は、HBVDNAを相補的な配列を持つ合成DNAでプレートに捕捉し、さらに枝分かれしたDNA鎖を有する合成DNA(分岐DNA)をシグナル増幅に用い、化学発光で検出する定量測定法である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の方法では、ヒト由来のDNAも増幅されることがしばしばあり、HBV特異的バンドを見極めるのに時間がかかり、また、検査結果を誤る原因にもなっている。

【0004】従って、本発明の目的は、高感度に、かつヒト由来のDNAを増幅することなく特異的にHBVを検出することができる、HBVの検出方法及びそのためのプライマーを提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、HBVのX遺伝子中の特定の領域にハイブリダイズする核酸プローブを用いて核酸増幅法を行うことにより、ヒト由来の核酸を増幅することなく、特異的かつ高感度にHBVを検出することができるを見出し本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくは該塩基配列に相補的な塩基配列のうち、連続する15塩基以上から成る塩基配列(ただし、TはUであってもよい)又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有する核酸から成り、かつ、該核酸を構成する塩基のうち、70%以上が配列番号1に示される塩基配列の1~173nt又は199nt~256ntの領域又はその相補的領域内に存在する、B型肝炎ウイルス検出用プライマーを提供する。また、本発明は、上記本発明のプライマーであって、配列表の配列番号1に示される塩基配列又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものをフォワード側プライマーとして用い、上記本発明のプライマーであって、配列表の配列番号1に示される塩基配列と相補的な配列又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものをリバース側プライマーとして用い、試料DNAを鉢型として用いた核酸増幅法により試料DNAを増幅し、増幅されたDNAを検出することを含む、B型肝炎ウイルスの検出方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】上記のように、本発明のHBV検出用プライマーは、配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくは該塩基配列に相補的な塩基配列のうち、連続する15塩基以上から成る塩基配列(ただし、TはUであってもよい)から基本的に成る。配列番号1に示される塩基配列は、HBV遺伝子(Mukaide et al., The

complete nucleotide sequence of hepatitis B virus, subtype adr (SRADR). Nucleic Acids Res 1992; 20:6

150. GenBank Accession No. D12980)の第1248番目の塩基(本明細書において、第1248番目の塩基を

「1248nt」のように表わし、他の位置の塩基についても同様に表わす)から1503ntに該当する。な

お、HBVのX遺伝子はHBV遺伝子の1248ntから始まるので、配列番号1に示す塩基配列はHBVのX

10 遺伝子の1ntから256ntに相当する。配列番号1に示す塩基配列において、174nt~198ntは、

ヒトとの相同性が高く、この位置にハイブリダイズする

プライマーを用いると、ヒト由来の核酸も増幅される度

があることを見出した。このため、本発明のプライマーでは、プライマーを構成する塩基のうち、70%以上、

好ましくは90%以上が配列番号1に示される塩基配列

の1~173nt又は199nt~256ntの領域又はその相補的領域内に存在する。また、配列番号1において、1nt~41ntの領域もヒトとの相同性がやや高いことも見出した。従って、この領域もなるべく避け

20 ことが好ましく、プライマーを構成する塩基の70%以上、さらに好ましくは90%以上が配列番号1に示される塩基配列の42~173nt若しくは19

9nt~256ntの領域又はその相補的領域内に存在

することが好ましい。さらに、配列番号1の88nt~139ntの領域は、HBVの株間の変異が大きいの

で、全てのHBVを検査対象とする場合には、この領域も避けた方が好ましく、従って、プライマーを構成する

塩基の70%以上、さらに好ましくは90%以上が配列

30 表の配列番号1に示される塩基配列の42~87nt、140~173nt若しくは199nt~256ntの

領域又はその相補的領域内に存在することが好ましい。

【0008】なお、プライマーは、HBVのX遺伝子の

上記領域にハイブリダイズすれば良いので、その塩基配列が必ずしもHBVのX遺伝子の部分領域又はその相補的領域の塩基配列と完全に一致している必要はなく、プライマーとして用いた核酸増幅法によりHBVのX遺伝

35 子の領域を増幅できるものであれば、プライマーを構成する塩基配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有するものであ

つてもよい。

【0009】プライマーのサイズは、15塩基以上であ

れば特に限定されないが、15塩基~50塩基が好まし

く、18塩基~35塩基がさらに好ましい。

【0010】本発明のプライマーのうち、フォワード側

プライマーとして特に好ましいものとして、配列番号1に記載された塩基配列の31nt~71nt、さらに好

40 ましくは38nt~84nt、さらに好ましくは41nt~61ntの領域中の連続する15塩基以上から成る

塩基配列を有するものを挙げることができる。これらの

うち、特に好ましいものとして、配列番号2で示される

塩基配列を有するプライマー (MHBXF1) を挙げることができる。また、フォワード側プライマーとして特に好みなものとして、配列番号1に記載された塩基配列の48nt～85nt、さらに好みしくは55nt～78nt、さらに好みしくは57nt～75ntの領域中の連続する15塩基以上から成る塩基配列を有するプライマーを挙げることができる。これらのうち、特に好みなものとして、配列番号4で示される塩基配列を有するプライマー (MHBXF2) を挙げができる。

【0011】本発明のプライマーのうち、リバース側プライマーとして特に好みるものとして、配列番号1に記載された塩基配列の185nt～142nt、さらに好みしくは178nt～149nt、さらに好みしくは175nt～156nt又は171nt～152ntの領域と相補的な配列中の連続する15塩基以上から成る塩基配列を有するものを挙げができる。これらのうち、特に好みるものとして、配列番号3で示される塩基配列を有するプライマー (MHBXR1) 及び配列番号5で示される塩基配列を有するプライマー (MHBXR3) を挙げができる。

【0012】本発明のHBVの検出方法は、試料DNAを錠型として用い、上記本発明のプライマーをフォワード側プライマー及びリバース側プライマーとして用いて常法により核酸増幅法を行い、増幅産物を検出することにより行うことができる。試料は、肝組織等の生体組織であってもよいし、血液や血清等の体液であってもよい。組織や体液からDNAを抽出する方法はこの分野において周知である。核酸増幅法自体は、この分野において周知であり、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により行うことができる。PCRを行うためのキット及び装置は市販されており、それらを用いて容易に行うことができる。核酸増幅法は、いわゆるnest ed形式で行うこともできる。すなわち、第1の核酸増幅を行い、その増幅産物を錠型として第2の核酸増幅で用いた一対のプライマーのうち少なくともいずれか一方は異なるプライマーを用いて第2の核酸増幅を行うことができる。nest ed形式で行うことにより、検出の精度をさらに高めることができる。なお、nest ed形式は、3段階以上で行うことも可能である。

【0013】増幅産物の検出方法もこの分野において周知であり、例えば、増幅産物をアガロースやポリアクリルアミド等のゲルを媒体とするゲル電気泳動にかけ、エチジウムプロミドで染色して紫外線を照射することにより検出することができる。あるいは、増幅産物の検出は、リアルタイムに行うこともできる。リアルタイム検出PCRはこの分野において周知であり、そのためのキット (Perkin Elmer TaqMan EZ RT-PCR Core Kit (商品名、Perkin Elmer社製)) も市販されているので、市販のキットを用いて容易に行うことができる。また、SYBR

Green (製品名: Molecular Probe, Inc.)など2本鎖DNAと結合し蛍光を発生する色素によってもリアルタイム検出できる。なお、リアルタイム検出PCRの場合は、プローブも用いるが、プローブがハイブリダイズする領域も、上記したプライマーがハイブリダイズする領域から選ぶことができる。すなわち、このようなプローブは、配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくは該塩基配列に相補的な塩基配列のうち、連続する15塩基以上から成る塩基配列 (ただし、TはUであってもよい) 又は該配列のうち10%以下の数の塩基が置換、欠失、挿入若しくは付加された塩基配列を有する核酸から成り、かつ、該核酸を構成する塩基のうち、70%以上が配列番号1に示される塩基配列の1～173nt又は199nt～256ntの領域又はその相補的領域内に存在するものである。また、プライマーの場合と同様に、配列番号1の1nt～41nt、88nt～139nt又はその相補鎖とハイブリダイズするものは避けることが好みしく、すなわち、これらの領域とハイブリダイズする部分はプローブを構成する塩基数の30%以下であることが好みしい。なお、リアルタイム検出PCRでは、PCRのサイクル数と蛍光強度の関係から、試料DNAを定量することが可能であり、従って、本明細書で言う「検出」には定量も含まれる。

【0014】本発明の方法によれば、ヒト由来のDNAを非特異的に増幅することなく、正確かつ容易にHBVを検出することができる。また、下記実施例において具体的に記載するように、本発明の方法によれば、HBsAg及びHBsAg陰性のC型肝臓癌患者の肝臓組織から高頻度にHBVを検出することができた。従って、本発明の方法により検出されるHBVはC型肝臓癌マーカーとして利用し得る。HBsAg及びHBsAg陰性の試料は、従来、遺伝子検査によてもHBVを検出することができなかつたものである。従来、HBsAg及びHBsAg陰性で、かつ従来の遺伝子検査によてもHBVを検出することができない肝臓を生体間移植した場合にHBV感染を起こす場合があることが知られており、本発明によりその原因が解明され、かつ、生体間移植前に本発明の方法により移植肝臓のチェックを行うことにより、移植された肝臓がHBV感染を起こし、さらには、癌に進行することを防止することができる。

【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0016】実施例1、比較例1～3

肝臓癌患者12人の肝臓組織より常法であるプロテアーゼK/フェノール・クロロフォルム抽出法によってDNAを抽出し、さらにRNase処理を行った。その各1μgを錠型として用い、本発明のプライマーである上記MHBXF1 (配列番号2) とMHBXR1 (配列番号

3) をプライマーとして用いて第1段階のPCRを行い、その増幅産物を鉛型として用い、本発明のプライマーである上記MHBXF2(配列番号4)とMHBXR3(配列番号5)をプライマーとして用いて第2段階のPCRを行った(以下、このnested PCRを行った合計4種類のプライマーのセット(用い方も上記と同様)を「プライマーセット1」と呼ぶ)。PCRの条件は、第1段階、第2段階とも、95℃、4分間インキュベートした後、94℃30秒間の変性工程、55℃40秒間のアニーリング工程、72℃、40秒間の伸長工程を35サイクル繰り返し、最後に72℃10分間インキュベートした。反応液は、宝酒造社製の市販のPCRキットを用い、キットの添付書類に記載されている方法に従い、1xEX Taq buffer、1xdNTP、20 pmolの各プライマー、1.25 UのEX-Taqとし、総体積は50 μlとした。一方、対照として、Paterini P. et al., Hepatology 21, 313-321, 1995に記載されたプライマーHBV24/26(配列番号6、7)(比較例1)、HBV16/19(配列番号8、9)(比較例2)又はHBVP1/P2(配列番号10、11)(比較例3)を用いて上記と同様の条件でPCRを行った。PCR産物は、常法によりアガロースゲル電気泳動にかけ、バンドを検出した。

【0017】その結果、本発明のプライマーセット1を用いた場合、陽性例は12例中8例であり、比較例1～3の協合、陽性例は、いずれも0例であった。これらの結果から、本発明のプライマーを用いた場合に、高感度にHBVを検出することができる事がわかる。特に、抗HCV抗体(HCVab)陽性でHBs抗原陰性、HBc抗原陰性例の9例では、本発明のプライマーを用いた場合、6例が陽性であったのに対し(検出率67%)、比較例のプライマーを用いた場合には、陽性例は皆無であった。一方、HBsAg陽性又はHBcAg陽性例では実施例1、比較例1～3のいずれにおいても陽性であった。

【0018】実施例2

プライマーセット1を用いた実施例1において、HBV-X遺伝子を検出できなかった肝臓組織由来DNAでクローニングX遺伝子断片を希釈した系列を用い、プライマーセット1を用いた実施例1の方法の感度テストを行った。なお、クローニングX遺伝子断片は、プライマーセット1のMHBXF1(配列番号2)とMHBXR1(配列番号3)でHBsAg陽性血清よりPCRを用いて増幅した産物をpGEMT(商品名;プロメガ社製)ベクターに組込みpMM5439としたものを用い、また、希釈系列はそのOD260nmからコピー数/m¹を算出して作製した。PCRの条件は、全て実施例1と同じであった。その結果、プライマーセット1の検出感度は、DNA 1 μg当たり5コピーであった。6log cells = 1 μgと概算して100万細胞当たりX遺伝子が5コピー検出できる計算となる。また、増幅バンドはいずれの

場合も1本だけであり、大部分のDNAがヒト由来であるにも拘らず、特異的に正確に検出を行うことができた。

【0019】実施例3、比較例4～6

HBsAg陰性、HCV抗体陽性のC型慢性肝炎患者の肝臓組織を用いて試験を行った。用いたプライマーは、上記プライマーセット1(実施例3)、第1段階のフォワード側プライマーとしてMHBV1(配列番号12、HBV遺伝子の1048nt～1070nt)及びMHBV2(配列番号13、HBV遺伝子の1057nt～1076nt)、リバース側プライマーとしてMHB214(配列番号14、HBV遺伝子の1483nt～1501nt)、第2段階のフォワード側プライマーとしてMHBV3(配列番号15、HBV遺伝子の1111～1133nt)及びMHBV4(配列番号16、HBV遺伝子の1137nt～1160nt)、リバース側プライマーとしてMHB214(比較例4)、又は第1段階のフォワード側プライマーとしてMHB215(配列番号17、HBV遺伝子の3148nt～3164nt)、リバース側プライマーとしてMHB6(配列番号18、HBV遺伝子の132nt～155nt)、第2段階のフォワード側プライマーとしてMHB215、リバース側プライマーとしてMHB235(配列番号19、HBV遺伝子の140nt～118nt)(比較例5)であった。PCR条件は、実施例1と同じであった。

【0020】さらに、比較例として、市販のリアルタイムPCRによるHBV検出用キット(ABI7700、Perkin-Elmer社製)を用いて試験を行った(比較例6)。用いたTaqMan(商品名)PCRプライマーは、フォワード側がFX(配列番号20、HBV遺伝子の1084nt～1102nt)、リバース側がRX(配列番号21、HBV遺伝子の1135nt～1154nt)、一方、TaqMan(商品名)PCRプローブは、PX(配列番号22、HBV遺伝子の1109nt～1133nt)であった。条件は、50mM KCl、10mM Tris-HCl、0.01M EDTA、pH8.3、3.5mM MgCl₂、200 μM dATP、200 μM dCTP、200 μM dGTP、200 μM dUTP、1.25 U AmpliTaq Gold(商品名、Perkin-Elmer社製)、0.5 U AmpErase UNG(商品名、Perkin-Elmer)、300 nM FX、300 nM RX、200 nM PX、50 μlでPCRを行った。PCRサイクルは50℃2分間、95℃12分間インキュベートした後、95℃1.5秒間、60℃1分間を7.5サイクル繰返した後、25℃で保温し検出を行った。

【0021】その結果、陽性数は、実施例3が6例、比較例4が3例、比較例5が4例、比較例6が4例であり、本発明の方法による場合が最も感度良く検出することができた。

【0022】実施例4、比較例7~10

C型慢性肝炎患者15人の血清から、常法であるプロテアーゼK/フェノール・クロロフォルム抽出法によってDNAを抽出し、さらにRNAse処理を行った。その各1μgを鉢型として用い、上記プライマーセット1を用いて実施例1と同様にnestedPCRを行った（実施例4）。一方、比較例として、上記比較例6と同様なリアルタイム検出PCR（比較例7）、TMA法（中外製薬）

社製キットを使用、比較例8）、市販のHBV野生株及び変異株検出用キットであるCorePromotor（商品名、住友金属社製、比較例9）及びPreC（商品名、住友金属社製、比較例10）を用いて試験を行った。また、各血清中のHBsAg及びHBsAgをRIA法により測定した。結果を下記表1に示す。

【0023】

【表1】

試料No.	HBsAg	HBsAg	コピー数(log/ml)		比較例9	比較例10	実施例4
			比較例7	比較例8			
1	-	-	-	試験せず	-	-	-
2	-	-	-	試験せず	-	-	-
3	+	-	-	試験せず	-	野生株	+
4	-	-	-	試験せず	-	-	+
5	+	-	-	試験せず	その他変異	突然変異株	+
6	+	-	-	試験せず	その他変異	野生株+突然変異株(30:70)	+
7	+	-	3.8	-	±	突然変異株	+
8	-	-	4.7	-	-	-	+
9	+	-	5.6	試験せず	突然変異株	突然変異株	+
10	+	-	8.5	4.9	突然変異株	突然変異株	+
11	+	+	7.3	6.1	突然変異株	野生株	+
12	+	+	8.1	6.4	その他変異	野生株+突然変異株(90:10)	+
13	+	+	8.2	6.9	その他変異	野生株	+
14	+	+	8.9	7.7	突然変異株	野生株	+
15	+	+	>9.0	試験せず	その他変異	試験せず	+

【0024】表1に示されるように、実施例4の方法が最も検出率が高かった。

【0025】

【発明の効果】本発明により、高感度に、かつヒト由来のDNAを増幅することなく特異的にHBVを検出することができる、HBVの検出方法及びそのためのプライマーが提供された。また、上記実施例1及び3から明らかなように、HBsAg、HBsAg陰性であるC型肝炎患者では、本発明の方法による陽性率が67%であり、一方、C型慢性肝炎では26.1%であり、C型肝炎患者で高率にHBVが検出された。従って、本発明の方

法は、C型肝炎患者での癌マーカーとしても期待される。さらに、従来の方法ではHBVを検出することができなかつB型肝炎抗原陰性検体からHBVを検出することができる、生体肝移植において、B型肝炎抗原陰性ドナーを移植前に本発明の方法で調べることにより、生体肝移植によるHBVの伝染を防止することも可能となる。

【0026】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：258

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

```
ATGGCTGCTC GGGTGTGCTG CCAACTCGAT CCTGGGGGGG ACGTCCTTG TCTACGTCCC 60
GTCGGCGCTG AATCCCGCCG ACCACCCGTC TCGGGGCGGT TTGGGCCCTCT ACCGTCCTCT 120
TCTTCATCTG CGGTTCCAGC CGACCACGGG CGCCACCTCT CTTCACGGCG TCTCCCCGTC 180
TGTGGCTTCT CATCTGGCGG TCCGTGTCCA CTTGGCTTCA CCTCTGCCAGG TCCCATGGAG 240
ACCACCGTGA ACGCCCC 256
```

【0027】配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

```
ACGTCCCTTG YCTACGTCCC G
```

【0028】配列番号：3

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

```
ACGTCCCTTG YCTACGTCCC G
```

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

11

12

鎖の数：一本鎖

配列

GGAGTCCCCG TAAAGAGAGC

20

【0029】配列番号：4

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

TCCCCTCGCC GCTGAATCC

19

【0030】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

10 鎖の数：一本鎖

配列

ACCCGGTAAA GAGACCTGCC

20

【0031】配列番号：6

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

TGCCAAGTGG ATCCCTCGCG CGACGTCCCT

30

【0032】配列番号：7

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

20 鎖の数：一本鎖

配列

CTTCACGGTG CTCTCCATG

19

【0033】配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

GTCCTAGGAA TCCTGATG

18

【0034】配列番号：9

配列の長さ：18

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

30 鎖の数：一本鎖

配列

GGGTCAACCAT ATTCTTGG

18

【0035】配列番号：10

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

AACCTTTCTG CTTCCTCTG

19

【0036】配列番号：11

配列の長さ：18

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

40 鎖の数：一本鎖

配列

AAGAGCTTGG CCAAGACC

18

【0037】配列番号：12

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

TGCCCAAGTGT TTGCTGAYGC AAC

23

【0038】配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

50 トポロジー：直鎖状

13

14

鎖の数：一本鎖

配列

TTTCCTCAGG CAACCCCCAC

【0039】配列番号：14

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

CGTTCACGGT CGTCYCCAT

【0040】配列番号：15

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

CTGACCCAAC CCCCACTCG

【0041】配列番号：16

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

GATCCATACT GCGGAACTCC TAGC

【0042】配列番号：17

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列

TGCTGGTGGC TCCAGITC

【0043】配列番号：18

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

CTAGAAAATT GAGAGAAGTC CACC

【0044】配列番号：19

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

AAGTCCACCA CGACTCTAGA CTC

【0045】配列番号：20

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

GGCTTGGCYA TNGGCCATC

【0046】配列番号：21

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

AGTTCCCGAG TATGGATCCC

【0047】配列番号：22

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列

TGGGTGGRAC CTTTGTGKCT CCTCT

20

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

19

トポロジー：直鎖状

10 鎖の数：一本鎖

19

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

24

トポロジー：直鎖状

20 鎖の数：一本鎖

18

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

24

トポロジー：直鎖状

30 鎖の数：一本鎖

23

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

19

トポロジー：直鎖状

40 鎖の数：一本鎖

20

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

25